

学校编码: 10384
学 号: 21720081152531

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

粘细菌的分离和次级代谢产物的研究

Study on Isolation and Secondary Metabolite
Discovery of *Myxobacteria*

常 宁 宁

指导教师姓名: 钱晓鸣 副教授

黄耀坚 教 授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 06 月

论文答辩日期: 2011 年 06 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2011 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
1 前言.....	1
1.1 粘细菌的研究	1
1.1.1 粘细菌的简介.....	1
1.1.2 粘细菌的分类.....	2
1.1.3 粘细菌的特性.....	7
1.1.4 粘细菌的应用.....	8
1.2 粘细菌次级代谢产物的研究	9
1.2.1 粘细菌次级代谢产物的特点.....	10
1.2.2 活性物质的作用机制.....	10
1.2.3 粘细菌中具有重要价值的次级代谢产物的研究进展.....	13
1.3 粘细菌研究面临的问题	19
1.3.1 粘细菌分离纯化方面的问题.....	19
1.3.2 粘细菌次级代谢产物分离纯化方面的问题.....	19
1.4 本课题研究目的、意义及内容	20
2 材料与方法	22
2.1 材料.....	22
2.1.1 土样来源.....	22
2.1.2 培养基.....	22
2.1.3 抗菌活性测定指示菌.....	25
2.1.4 抗肿瘤活性测定细胞株.....	25
2.1.5 菌株分离纯化用抗生素.....	25
2.1.6 生物活性测定试剂.....	25
2.1.7 分子鉴定所用试剂.....	26
2.1.8 化合物的分离纯化常用有机溶剂及显色剂.....	27
2.1.9 主要试剂及耗材.....	27
2.1.10 主要仪器.....	28
2.2 方法.....	29
2.2.1 研究技术路线.....	29
2.2.2 粘细菌的分离纯化.....	30
2.2.3 菌株发酵及粗提物的制备.....	32
2.2.4 生物活性的测定.....	34

2.2.5 菌株分子分类鉴定.....	35
2.2.6 天然产物的分离纯化.....	37
2.2.7 化合物的结构测定.....	40
3 结果与分析	41
3.1 粘细菌的分离纯化和鉴定	41
3.2 粘细菌的物种多样性	46
3.3 粘细菌的液体小量发酵及粗提物 TLC 检测	50
3.4 粘细菌抗菌活性测定	51
3.5 粘细菌抗肿瘤活性测定	51
3.6 粘细菌抗氧化活性测定	52
3.7 粘细菌次级代谢产物研究	53
3.7.1 出发菌株的选择.....	53
3.7.2 菌株 XMU-Mx-76 发酵培养基的选择	53
3.7.3 菌株 XMU-Mx-76 发酵预实验	54
3.7.4 XMU-Mx-76 40L 液体发酵及粗提物制备	56
3.7.5 次级代谢产物的分离纯化.....	57
3.7.6 化合物结构解析.....	59
3.7.7 化合物抗菌抗肿瘤活性测定.....	67
4 讨论.....	69
4.1 粘细菌的分离纯化	69
4.2 粘细菌的种属多样性	70
4.3 粘细菌的抗菌、抗肿瘤活性及抗氧化活性筛选	71
4.4 菌株 XMU-Mx-76 次级代谢产物的研究	71
5 结论与展望	73
参考文献.....	75
致谢.....	84
附录.....	85

Catalogue

Abstract in chinese	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Study on the Myxobacteria	1
1.1.1 The introduction of Myxobacteria	1
1.1.2 The taxonomy of Myxobacteria.....	2
1.1.3 The features of Myxobacteria	7
1.1.4 The applications of Myxobacteria	8
1.2 Study on the secondary metabolites of Myxobacteria	9
1.2.1 The features of metabolites	10
1.2.2 Mechanism of the active metabolites.....	10
1.2.3 Research development of some important metabolites	13
1.3 The problem facing in the study of Myxobacteria	19
1.4 Purpose, significance and content of this thesis	20
2 Material and methods	20
2.1 Material	22
2.1.1 Soil samples	22
2.1.2 Medium	22
2.1.3 Indicator bacteria	25
2.1.4 Tumor cell line.....	25
2.1.5 Antibiotics.....	25
2.1.6 Reagent used in bioactivity test	25
2.1.7 Reagent used in phylogenetic analysis	26
2.1.8 Chromogenic reagents for secondary metabolite isolation.....	27
2.1.9 Others	27
2.1.10 Main equipments.....	28
2.2 Methods	29
2.2.1 Technology route	29
2.2.2 Isolation, Purification and preservation of Myxobacteria.....	30

2.2.3 Fermentation and preparation of crude extract	32
2.2.4 Antibiotic activity	34
2.2.5 Phylogenetic analyses	36
2.2.6 Isolation of secondary metabolites.....	37
2.2.7 Identification of compounds	40
3 Results and discussion	41
3.1 Isolation, Purification and preservation of Myxobacteria	41
3.2 Liquid fermentation and TLC experiment of crude extracts	46
3.3 Screen of antibiotic activities	50
3.4 Screen of anti-tumor activities.....	51
3.5 Screen of anti-oxidation activities.....	51
3.6 Phylogenetic analysis of Myxobacteria	52
3.7 Study of secondary metabolites	53
3.7.1 The choose of the right strian.....	53
3.7.2 The choose of the medium.....	53
3.7.3 Study of the physiological in the fermentation	54
3.7.4 Fermentation and preparation of crude extract of XMU-Mx-76	56
3.7.5 Isolation and purification of secondary meabolites	57
3.7.6 Structure analysis of the compounds	59
3.7.7 Activity test of compounds	67
4 Discussion.....	69
4.1 The isolation and purification of Myxobacteria.....	69
4.2 Phylogenetic analyses.....	70
4.3 Screen of antibiotic and anti-tumor activities	71
4.4 Study of secondary metabolites of XMU-Mx-76	71
5 Conclusion and Prospect.....	73
References	75
Acknowledgements	84
Appendix.....	85

摘 要

天然产物是药物的重要来源,目前超过 40%的临床药物是天然产物或者是以天然产物为先导化合物改造获得的。近年来,粘细菌由于其次级代谢产物结构新颖,生物活性多样而备受关注,成为发展新药的重要来源。

本论文以河南、安徽、福建、青海等地的土样为研究材料,采用灭活酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)和灭菌滤纸片诱导等方法对粘细菌子实体进行诱导、富集及分离纯化,并采用改进的纯化方法,从而使噬细菌类粘细菌的纯化率达到 100%,并且也在一定程度上提高了噬纤维类粘细菌的纯化效率。

通过对 95 份土样的分离得到 117 株粘细菌,并从中纯化出 54 株(包括 39 株噬细菌粘细菌和 15 株噬纤维类粘细菌),对已纯化的 54 株粘细菌进行分子鉴定,16S rDNA 的序列分析结果表明这些菌株分布于四个属中,分别是粘球菌属(*Myxococcus*)、珊瑚球菌属(*Corallococcus*)、堆囊菌属(*Sorangium*)和多囊菌属(*Polyangium*)。

以 5 株细菌和 2 株真菌为指示菌,对分离纯化得到的 54 株粘细菌采用滤纸片法进行抗菌活性检测,结果表明,有 25 株对指示菌显示出一种或者几种的抗菌活性,占供测菌株的 46.2%。采用 MTT 法对 54 株供测菌株进行抗肿瘤活性测定,结果显示有 36 株对 HeLa 或 HepG2 有不同程度的细胞毒活性,占供测菌株的 66.7%。其中对 HeLa 和 HepG2 都有细胞毒活性的有 22 株。采用 DPPH 法对粘细菌菌株进行抗氧化活性测定,结果显示 54 株待测菌株中有 11 株表现出了一定的抗氧化活性,占供测菌株数的 20.3%。

对菌株 XMU-Mx-76 的次级代谢产物进行了初步研究,从菌株 XMU-Mx-76 的发酵产物中分离鉴定了 N-4、N-5、N-6、N-7 共 4 个化合物。其中 N-4 为新化合物,化学名为 2-(4-aminobenzyl)-5-((2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)imidazolidin-4-one。N-5 具有微弱的抗细菌活性。

研究表明,自然界中蕴含着丰富的粘细菌菌种资源,大部分菌株都具有一定的生物活性,并能产生结构新颖的次级代谢产物,因此粘细菌是天然产物的重要来源。

关键词: 粘细菌; 分离; 活性筛选; 次级代谢产物

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Nature products are important source of Medicine. More than 40% of important clinical medicines are from microbial secondary metabolites. Nowadays, many types of novel compound with good biological activities are found from Myxobacteria. So Myxobacteria become an important resource of Medicine.

The soil samples collected from Henan, Anhui, Fujian, Qinghai and Chongqing, were used as the materials in this experiment. The dead cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* can be used to induce fruiting bodies of Myxobacteria in different colors, size and shapes. And then we use new purification methods, so we can purify bacteriolytic group in one hundred percent, and it's more easy to purify the cellulolytic group.

Through studying on some soil samples which were collected from some cities of China, from 95 soil samples, 117 *Myxobacteria* strains were isolated and 54 strains of them were purified. The identification of 54 *Myxobacteria* strains by 16SrDNA assay and phylogenetic analysis indicated that the strains were distributed in 4 genera and a lot of the strains were *Myxococcus* spp., *Sorangium* spp..

Crude fermentation extraction of each strain was tested by several different bioactive screening programs including anti-microbial activity, anti-tumor activity and anti-oxidation activity. 5 strains of bacteria and 2 strains of fungi were used as indicator strains in the antibiotic activity test of 54 strains of Myxobacteria. The result of the bioactive tests showed that 46.2 % of total displayed activity against at least one kind of bacterium. MTT method was used to detect the anticancer activity of 54 strains of Myxobacteria. Results showed that, 66.7% of total displayed activity on HeLa and HepG2 cells. DPPH method was used to detect the anti-oxidation activity, about 20.3% showed the anti-oxidation activity.

Secondary metabolites of XMU-Mx-76 were studied preliminarily. From the fermentation product, four compounds were purified and the structures were made clear with the aid of ESI-MS and NMR. Among them, N-4 is a new compound, 2-(4-aminobenzyl)-5-((2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl)imidazolidin-4-one. Antibiotic, anti-tumor activities were tested of the four compounds. N-5 showed weak antibiotic activities.

Results showed that Myxobacteria have antimicrobial activity and antitumor activity, and Myxobacteria can yield novel secondary metabolites, which make Myxobacteria to be an important source of natural products.

Key words: Myxobacteria; isolation; bioactivity; secondary metabolites

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

1.1 粘细菌的研究

1.1.1 粘细菌的简介

粘细菌是一类可在固体表面滑行运动的革兰氏阴性菌，多数是杆状，大小一般为 $0.4 \times 1.5 \mu\text{m} - 2 \times 15 \mu\text{m}^{[1,2]}$ （其营养细胞如图 1.1），是具有社会性的高等原核生物，具有复杂的多细胞行为和形态发生，能够在细胞间通过信号的传递和感应，协同摄食、运动和发育形成子实体，因具有显著的社会学特征、复杂的多细胞行为和形态发生使它在细胞分化、发育和生物进化研究中占有重要地位，是众多研究方向的著名模式材料^[3-5]。同时粘细菌也是一类已经引起广泛关注但却研究尚少的重要药源微生物类群^[6]。

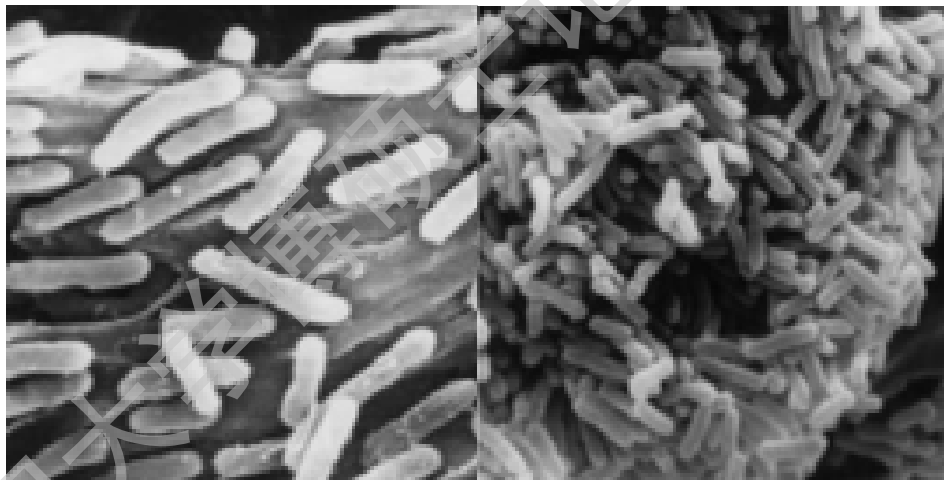


图 1.1 粘细菌的营养细胞

Fig.1.1 The vegetative cell of Myxobacteria

粘细菌广泛分布在中性或微碱性的土壤中，也可以在朽木、树皮、地衣和草食动物的粪便等腐物上生长^[7,8]，大部分粘细菌的最适生长温度为 $28-35^{\circ}\text{C}$ ，其营养类型为有机化能自养型，能够降解多种大分子。粘细菌的细胞形状一般可以分为两类：一类细胞细长，有弯曲或其末端渐渐变尖，另一类细胞则相对粗壮，末端较钝圆。它们均可以在固体表面滑行，在营养贫瘠的培养基上扩散较大成菌膜，而在营养较丰富的培养基上则形成小而突出的菌落。此外，有的粘细菌存在于气候比较特殊的地方，如高盐浓度的淤泥^[9]、干燥的沙漠土壤中^[10]和热带雨林生境

中^[11, 12]，李越中等 1997 年分离到了能耐受高盐度生长的粘细菌^[13]，说明粘细菌具有一定的耐盐能力，且其休眠体对外界也有很强的抗性。不同的生境中所分布的粘细菌具有一定的差异，如软骨霉状菌在美国中部更多分离自树皮或腐木上，而在印尼软骨霉状菌多分离自植物根际土壤、及动物粪便中。

1.1.2 粘细菌的分类

分类依据：主要有形态学特征和生理生化特征。分类：根据细胞形态学，粘细菌分为 6 个科，21 个属，约 50 多个种^[14]，根据 16S rDNA 的序列分析结果，已发现的粘细菌大致可分为三个亚目：孢囊杆菌亚目(*Cystobacterinae*)、小囊菌亚目(*Nannocystineae*)和堆囊菌亚目(*Sorangineae*)^[15]，具体分类单元如表 1.1 所示。从生理上，根据粘细菌的食性，可以将粘细菌分成两大类群：一类是可以降解利用活细菌胞体，但不能利用纤维素的，属于溶细菌类群(bacteriolytic group)；另一类是不能分解利用活细菌(但可以分解死菌菌体)，却能降解利用纤维素大分子的，属于溶纤维素类群 (cellulolytic group)^[16]。

表 1.1 根据 16S rDNA 对粘细菌的分类^[17]Tab.1.1 The taxonomy of *Myxobacteria* by 16S rDNA

亚目	科	属	种
抱囊杆菌亚目 (<i>Cystobacterinae</i>)	粘球菌科 (<i>Myxococcaceae</i>)	粘球菌属 (<i>Myxococcus</i>)	橙色粘球菌 (<i>Mx.fulvus</i>)
			具枝粘球菌 (<i>Mx .stipitatus</i>)
			变绿粘球菌 (<i>Mx. Virescens</i>)
			黄色粘球菌 (<i>Mx.xanthus</i>)
			珊瑚粘球菌 (<i>Mx. Coralloides</i>)
			淡黄粘球菌 (<i>Mx. Flavescens</i>)
			大孢粘球菌 (<i>Mx. macrosporus</i>)
		珊瑚菌属 (<i>Corallococcus</i>)	珊瑚状珊瑚球菌 (<i>Cc.coralloides</i>)
			弱小珊瑚球菌 (<i>Cc.exiguus</i>)
			大孢珊瑚球菌 (<i>Cc.macrosporus</i>)
		囊球菌属 (<i>Angiococcus</i>)	盘状囊球菌 (<i>A.disciformis</i>)
		<i>Pyxidicoccus</i> 属	
		<i>Anaeromyxobacter</i> 属	
		原囊菌属 (<i>Archangium</i>)	过渡原囊菌 (<i>Ar.gephyra</i>)
			深褐抱囊杆菌 (<i>Cb. Focus</i>)

	抱囊杆菌科 (<i>Cytobacteraceae</i>)	抱囊杆菌属 (<i>Cystobacter</i>)	生锈抱囊杆菌 (<i>Cb.ferrugineus</i>) 紫色抱囊杆菌 (<i>Cb.violaceus</i>) 具盖抱囊杆菌 (<i>Cb.velatus</i>) 小抱囊杆菌 (<i>Cb.minus</i>) 盘状抱囊杆菌 (<i>Cb.disciformis</i>)
		蜂窝囊菌属 (<i>Melittangium</i>)	牛肝菌蜂窝囊菌 (<i>M.boletus</i>) 地衣菌蜂窝囊菌 (<i>M.lichenicola</i>) 白色总状花序蜂窝囊菌 (<i>M.alboraceum</i>)
		标桩菌属 (<i>Stigamatella</i>)	橙色标桩菌 (<i>Sg.aurantiaca</i>) 直立标桩菌 (<i>Sg.erecta</i>)
		单囊菌属 (<i>Haploangium</i>)	较小单囊菌 (<i>H.minor</i>) 七皱纹单囊菌 (<i>H.rugisseptm</i>)
小囊菌亚目	<i>Kofleria</i> 科	<i>Kofleria</i> 属	<i>Kofleria flava</i>
		<i>Haliangium</i> 属	
		<i>Enhygromyxa</i> 属	

(Nannocystineae)		Plestiocystis 属	
	小囊菌科 (Nannocystaceae)	小囊菌属 (Nannocystis)	超级小囊菌 (<i>Na.exedens</i>) 侵蚀小囊菌 (<i>Na.aggrogans</i>)
堆囊菌亚目 (Sorangineae)	多囊菌科 (Polyangiaceae)	多囊菌属 (Polyangium)	卵黄状多囊菌 (<i>P.vitellinum</i>) 黄色多囊菌 (<i>P.luteum</i>) 塔氏多囊菌 (<i>P.thaxteri</i>) 聚粒多囊菌 (<i>P.sorediatum</i>) 多泡沫多囊菌 (<i>P.spumosum</i>) 如烟多囊菌 (<i>P.fumosum</i>) 寄生多囊菌 (<i>P.parasiticum</i>) 纤维多囊菌 (<i>P.cellulosum</i>)
		堆囊菌属 (Sorangium)	纤维堆囊菌 (<i>So.cellulosum</i>) 组合堆囊菌 (<i>So.compositum</i>)
			藏红花软骨霉状菌 (<i>Cm.crocatus</i>) 尖软骨霉状菌 (<i>Cm.apiculatus</i>)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库